

Mentype[®] DIPscreen

PCR Amplification Kit

Mode d'emploi



0483

Pour le diagnostic in vitro

DISIFU02v2fr
10.09.2025



45-12300-0025
45-12300-0100



Code du lot



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY
Site website: www.biotype.de
E-mail: support@biotype.de
Commande: sales@biotype.de

Avis de modification

Veillez noter les adaptations suivantes par rapport à la version précédente du mode d'emploi :

Code du document	Modifications	Date
DISIFU02v1fr	Version initiale	09.07.2025
DISIFU02v2fr	Ajout concernant les interférences dans le chapitre Restrictions d'utilisation	10.09.2025

Une version imprimée de ce mode d'emploi peut être fournie gratuitement dans un délai de 7 jours.

N'hésitez pas à nous contacter si vous souhaitez l'obtenir ou si vous avez d'autres questions :

au +49 351 8838 400 ou

support@biotype.de

Contenu

Objectif visé	4
Contexte scientifique	4
Description du produit	5
Matériel fourni	7
Contenu du kit	7
Dégradation des composants	8
Stockage et manipulation des réactifs	9
Matériel et dispositifs requis mais non fournis	9
Équipement général de laboratoire	9
Réactifs, kits et consommables.....	10
Instruments et logiciel	11
Échantillons et échantillons de test.....	12
Avertissements et précautions à prendre	13
Note à l'attention de l'utilisateur	14
Procédure	15
Aperçu du flux de travail expérimental	15
Préparation des échantillons.....	15
Exigences relatives aux échantillons bruts.....	15
Extraction de l'ADN	16
Quantification and dilution de l'ADN.....	16
Stockage de l'ADN	17
Préparation du contrôle	18
Contrôle positif.....	18
Contrôle sans matrice.....	18
Préparation du mélange maître.....	18
Amplification de la PCR	20
Électrophorèse capillaire sur gel	22
Préparation des produits de PCR	22

Analyse de la longueur des fragments.....	23
Analyse des données	26
Procédure générale d'analyse des données.....	26
Validation de l'exécution du flux de travail	27
Contrôle sans matrice.....	29
Analyse des échantillons.....	30
Analyse des données du flux de travail.....	30
Analyse qualitative - identification des loci informatifs	31
Analyse semi-quantitative – analyse du chimérisme	31
Analyse des données avec	33
Analyse des données avec	35
Préparation du logiciel.....	35
Dépannage.....	38
Évaluation des performances.....	41
Données sur les performances cliniques	51
Contrôle qualité.....	54
Assistance technique.....	54
Références.....	54
Restrictions d'utilisation	55
Informations sur les commandes	56
Marques et clauses de non-responsabilité	57
Explication des symboles.....	58
Annexe	60

Objectif visé

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est un essai manuel destiné à être utilisé avec de l'ADN génomique extrait d'échantillons de sang total veineux périphérique prélevés chez des patients adultes atteints de leucémie ayant subi une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT).

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit détecte 33 polymorphismes par insertion-délétion (DIP) et l'amélogénine dans une réaction PCR multiplexe. Avant la greffe de cellules souches hématopoïétiques, ces polymorphismes sont utilisés pour le dépistage qualitatif des génotypes du patient et du donneur et pour identifier les allèles DIP spécifiques au patient. Ces allèles informatifs sont analysés afin d'effectuer un suivi semi-quantitatif du chimérisme après la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques.

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est destiné aux utilisateurs professionnels formés aux techniques de génétique moléculaire, à la PCR multiplexe et à la manipulation des Genetic Analyzers de Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems).

Contexte scientifique

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT) est une option thérapeutique pour guérir les patients atteints de maladies hématologiques malignes et non malignes, telles que la leucémie. L'analyse du chimérisme est utilisée pour déterminer le mélange de cellules hématopoïétiques du donneur et du receveur chez les receveurs d'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques afin de détecter les premiers signes de rejet du greffon. Le sang veineux périphérique humain est utilisé pour le génotypage et la surveillance. Selon les directives CLSI (MM05-A2 2e édition), les anticoagulants tels que l'EDTA et le citrate sont recommandés pour le prélèvement sanguin. En fonction du succès de la greffe, différentes formes de chimérisme hématopoïétique (complet, mixte ou perte) peuvent se développer. Différentes approches sont utilisées pour l'analyse du chimérisme, notamment l'hybridation in situ en fluorescence (FISH), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP),

l'analyse de la numération globulaire et les méthodes basées sur la PCR. L'analyse des polymorphismes d'insertion-délétion (INDEL ou DIP) permet une analyse semi-quantitative du chimérisme à l'aide d'approches PCR multiplexes, ainsi qu'une analyse quantitative avec application spécifique à un allèle sur des plateformes qPCR ou dPCR. Par conséquent, ces essais DIP sont indispensables pour une surveillance sensible du chimérisme. Afin de détecter les premiers signes de rejet du greffon, une analyse du chimérisme doit être effectuée à intervalles réguliers et peu après la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques.

Description du produit

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est un kit d'amplification par réaction en chaîne par polymérase multiplexe (PCR) développé pour la surveillance du chimérisme. Pour la discrimination donneur-receveur, des polymorphismes d'insertion-délétion bialléliques (INDEL ou DIP) présentant un taux d'hétérozygotie très élevé et une distribution allélique équilibrée sur 19 chromosomes (voir [Tableau 1](#)) sont amplifiés simultanément dans une seule réaction PCR. Une amorce pour chaque locus est marquée au fluorophore 6-FAM™, BTG ou au BTY. Les produits de PCR sont ensuite analysés par électrophorèse capillaire sur gel.

Tableau 1 Informations spécifiques au locus du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, HLD = DIP du locus humain, -DIP = délétion, +DIP = insertion

DIP locus	Position chromosomique	DIP locus
Panel FAM		
AM X	Xp22.1-22.3	
AM Y	Yp11.2	
HLD106	16q13	-/AATGCGT
HLD70	6q16.1	-/AGCA
HLD84	8q24.12	-/CTTTC
HLD103	12q23.1	-/GCTTATAA
HLD104	13q32.1	-/ACTC
HLD116	18p11.22	-/AGGTGTGCAACAACATGATAC
HLD112	17p12	-/TTGTA
HLD307	Xp11.23	-/TCAACCAA
HLD310	2p22.3	-/GTCTGGTT
HLD110	16q22.1	-/TCCCTG
HLD133	3p22.1	-/CAACCTGGATT

DIP locus	Position chromosomique	DIP locus
HLD79	7q31.2	-/AATCT
HLD105	14q24.3	-/ATAGACAA
HLD140	3q23	-/GGTAGTATGGGCCT
HLD163	12q24.31	-/AACTACGGCACGCC
Panel BTG		
HLD91	11q14.1	-/GATA
HLD23	18p11.32	-/CTTTAA
HLD88	9q22.33	-/CCACAAAGA
HLD101	15q26.1	-/GTAG
HLD67	5q33.3	-/CTACTGAC
HLD301	17q21.32	-/CAGGGGCTC
HLD53	3q22.1	-/ATGT
HLD97	13q13.1	-/AGAGAAAGCTGAAG
HLD152	16p13.2	-/TGGTCAAAGGCA
HLD128	1q31.3	-/ATTAAATA
HLD134	5q11.2	-/ATGATGGTTCTTCAGA
HLD305	20q11.22	-
		/CAAGGTCCCACCACACTCGCGTGGGA
Panel BTY		
HLD48	2q11.2	-/GACTT
HLD114	17p13.2	-/TCCTATTCTACTCTGAAT
HLD304	9q34.3	-/GAGCTGCTCAAGAGAGAGG
HLD131	7q36.2	-/TTGGGCTTATT
HLD38	1q32.2	-/TAGTT
HLD82	7q21.3	-/ACCTCCTACTCCTTGGTCTATTCCTG GTCACATGTA

L'essai a été validé par une analyse du chimérisme réalisée sur plus de 200 paires de donneurs et receveurs apparentés compatibles HLA et son adéquation a été confirmée dans le cadre d'une étude d'évaluation clinique comparative.

La limite de détection pour l'analyse qualitative est de 200 pg d'ADN génomique.

La plage de dosage dans des conditions standard est comprise entre 1,0 et 2,0 ng d'ADNg. La quantité optimale d'ADNg est de 2 ng dans des conditions standard.

Une sensibilité de 1,4 % LoD95 (limite de détection) peut être obtenue en utilisant 2 ng d'ADNg comme dose pour l'analyse de marqueurs informatifs. Pour atteindre la sensibilité susmentionnée, il est recommandé d'utiliser autant de marqueurs informatifs que possible.

Matériel fourni

Contenu du kit

Tableau 2 Contenu du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit

Réactif	Couleur du capuchon	Volume par taille d'emballage	
		25 réactions	100 réactions
Nuclease-Free Water	Bleu clair	1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Violet	125 µL	500 µL
Mentype® DIPscreen Primer Mix	Rouge	125 µL	500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Blanc	15 µL	60 µL
Control DNA XY82 (2 ng/µL)	Blanc	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Orange	13 µL	50 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Vert	25 µL	25 µL

Un aperçu des numéros de lot du composant figure sur l'étiquette située à l'intérieur du rabat de la boîte.

REMARQUE

Veuillez noter que la taille de l'emballage correspond au nombre de tests **sans** tenir compte du nombre de contrôles requis ou de l'excédent nécessaire pour le pipetage.

i

Nous recommandons d'utiliser la taille suivante pour le débit correspondant:

- < 8 échantillons par série de PCR: taille de l'emballage 25 réactions
- ≥ 8 échantillons par série de PCR: taille de l'emballage 100 réactions

Dégradation des composants

Nuclease-Free Water: Eau de qualité PCR, utilisée dans la préparation de la PCR et comme contrôle sans matrice (NTC).

Reaction Mix A: Tampon PCR contenant des dNTPs et du MgCl₂. Le tampon PCR est optimisé pour favoriser l'activité enzymatique pour la PCR.

Mentype® DIPscreen Primer Mix: mélange d'amorces oligonucléotidiques multiplexes contenant une amorce marquée (marqueur: 6-FAM™, BTG, BTY) et des amorces non marquées.

Multi Taq 2 DNA Polymerase: ADN polymérase Taq hot start, 2,5 U/μL.

Control DNA XY82 (2 ng/μL): ADN génomique isolé à partir de sang EDTA provenant d'un seul donneur masculin. L'ADN doit être utilisé comme contrôle positif externe qualitatif pour le Mentype® DIPscreen Amplification Kit.

REMARQUE



L'Control DNA XY82 n'est pas critique pour les professionnels de laboratoire, car il s'agit de molécules d'ADN individuelles qui ont été purifiées, sont inoffensives et n'ont aucune fonction biologique active. Il ne contient aucune cellule vivante ni aucun organisme pathogène susceptible de constituer une menace directe.

DNA Size Standard 550 (BTO): mélange de fragments PCR marqués par un fluorophore dont la longueur est comprise entre 60 et 550 pb. Le composant est ajouté à chaque produit de PCR avant l'analyse de la longueur des fragments. Il est utilisé pour une régression de taille afin de déterminer avec précision la longueur des fragments des produits de PCR.

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder: mélange de produits de PCR artificiels représentant tous les allèles détectés par l'essai, utilisé comme référence de génotypage pour l'identification exacte des allèles.

Stockage et manipulation des réactifs

Le kit est expédié dans de la glace carbonique. Les composants du kit doivent arriver congelés, à l'exception de l'Multi Taq 2 DNA Polymerase qui est conservé dans un tampon empêchant la congélation du réactif.

Vérifiez que le kit est complet à la réception. N'utilisez pas les kits qui étaient décongelés à leur arrivée. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés, ou si les tubes ou l'emballage ont été endommagés pendant le transport, les performances ne peuvent être garanties.

Conservez tous les composants entre -25 °C et -15 °C, à l'abri de la lumière. Le Mentype® DIPscreen Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) et l'Mentype® DIPscreen Allelic Ladder doivent notamment être conservés à l'abri de la lumière.

Afin d'éviter toute contamination, nous recommandons de conserver et d'utiliser les composants de préamplification (échantillons d'ADN, Control DNA XY82) et les composants de postamplification (DNA Size Standard 550 (BTO) et Mentype® DIPscreen Allelic Ladder) sont stockés et utilisés séparément des réactifs PCR (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A et Mentype® DIPscreen Primer Mix).

Le kit expirera conformément aux informations figurant sur l'étiquette de l'emballage ou 12 mois après ouverture, selon la première éventualité. Ne dépassez pas un maximum de 20 cycles de congélation-décongélation.

Matériel et dispositifs requis mais non fournis

Équipement général de laboratoire

- Centrifugeuse de paillasse avec un rotor pour tubes de réaction de 2 mL et 200 µL
- Centrifugeuse avec rotor pour plaques de microtitrage pour plaques de réaction à 96 puits
- Mélangeur à vortex
- Pipettes calibrées et réglables avec embouts filtrants jetables étanches aux aérosols

- Plaques de réaction à 96 puits de 200 µL ou tubes de réaction de 200 µL avec matériel de fermeture correspondant, qualité PCR
- Supports adaptés aux tubes de réaction de 2 mL et 200 µL
- Support de refroidissement adapté aux tubes de 2 mL
- Gants jetables non poudrés
- NanoDrop™ One Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) ou Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)

REMARQUE



Tout le matériel utilisé pour la PCR doit être de qualité appropriée (exempt d'ADN et destiné à la biologie moléculaire). Veuillez vous assurer que tous les instruments utilisés ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.

Réactifs, kits et consommables

Tableau 3 Réactifs requis mais non fournis

Réactif	Fournisseur	Numéro de commande
Matrix Standard BT5 multi (25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0025
Matrix Standard BT5 multi (2 x 25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	BIOTYPE GmbH	46-14800-0000
QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (IVD)	Qiagen	61104
NucleoSpin® DX Blood (IVD)	Macherey-Nagel	740899.50
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Thermo Fisher Scientific	4311320
POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393715
POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393708
Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4393927
Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4408256
3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm	Thermo Fisher Scientific	4404683

Réactif	Fournisseur	Numéro de commande
3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm	Thermo Fisher Scientific	4404685

Instruments et logiciel

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a été validé pour être utilisé avec les thermocycleurs PCR suivants:

- ProFlex PCR System (N° de cat.: 4484073 (bloc d'échantillons 3 x 32 puits), 4484075 (bloc d'échantillons 96 puits), Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (arrêté, N° de cat. : N805-0200, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (N° de cat.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (N° de cat. : 846-2-070-214, Analytik Jena)

Un seul des instruments mentionnés ci-dessus est nécessaire pour effectuer le test.

L'utilisation d'autres instruments que ceux mentionnés ci-dessus doit être validée par l'utilisateur. Les spécifications suivantes doivent être respectées :

- Couvercle chauffant
- Bloc adapté aux plaques/tubes de réaction de 200 µL
- Montée en température réglable de 4 à 5 °C/s

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a été validé pour être utilisé avec les thermocycleurs PCR suivants:

- Logiciel Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), version 4.0.1
 - POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzer
 - POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzer
 - 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm
 - 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a été validé pour être utilisé avec les logiciels suivants. Un seul des logiciels mentionnés ci-dessous est

nécessaire pour analyser et évaluer les données. Une évaluation manuelle des fichiers fsa ou de tout résultat fourni avec le logiciel de collecte de données sans l'une des deux options logicielles décrites pour l'analyse et l'évaluation des données n'est pas validée.

- ChimerisMonitor IVD, version 3.0.x (BIOTYPE GmbH)
- Logiciel GeneMapper™ ID-X, version 1.6 (Thermo Fisher Scientific), utilisant les éléments suivants spécifiques au produit:
 - AnalysisMethod: DIPscreenIVD_Analysis4_v1x ou DIPscreenIVD_Analysis7_v1x
 - Bin: DIPscreenIVD_Bins4_v1x ou DIPscreenIVD_Bins7_v1x
 - Panel: DIPscreenIVD_Panel4_v1x ou DIPscreenIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

REMARQUE



Assurez-vous que tous les instruments utilisés ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.

Échantillons et échantillons de test

Les échantillons suivants ont été validés avec le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit:

- ADN génomique isolé à partir de sang total périphérique humain (EDTA, citrate, héparine) à des fins de surveillance et de génotypage.

L'ADNg isolé doit être conservé non dilué à une température comprise entre -25 °C et -15 °C.

REMARQUE



Veuillez vous assurer que l'anticoagulant utilisé pour le prélèvement sanguin est compatible avec les instructions du fabricant du kit d'isolement d'ADN.

Avertissements et précautions à prendre

- Lisez attentivement le mode d'emploi avant d'utiliser le produit.
- Lisez les fiches de données de sécurité (SDS) et les déclarations de non-danger (NHS) pour tous les produits BIOTYPE, disponibles sur demande ou sur notre page d'accueil (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblätter). Pour les produits qui ne nécessitent pas de fiche de données de sécurité car ils ne contiennent pas de SVHC ou sont soumis à d'autres restrictions du règlement 1272/2008 (CLP), BIOTYPE fournit les SDS sur demande.
- Veuillez contacter les fabricants de matériel et réactifs requis, mais non fournis, pour obtenir des copies des fiches de données de sécurité pour tout réactif supplémentaire nécessaire.
- Les composants des différents lots de kits ne doivent pas être mélangés.
- L'aliquotage des composants du kit dans d'autres récipients de réaction n'est pas autorisé.
- L'utilisation de ce produit est limitée aux utilisateurs de laboratoire professionnels formés aux techniques de génétique moléculaire, à la PCR multiplexe et à la manipulation des Genetic Analyzers de Thermo Fisher Scientific.
- Avant la première utilisation, vérifiez le produit et ses composants pour vous assurer de ce qui suit :
 - Intégrité
 - Exhaustivité en termes de nombre, de type et de remplissage (voir chapitre Matériel fourni)
 - Étiquetage correct
 - Congélation à la réception (à l'exception de l'Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- Les échantillons doivent toujours être traités comme infectieux et/ou présentant un risque biologique, conformément aux procédures de sécurité en laboratoire et aux bonnes pratiques de laboratoire.
- N'utilisez pas un kit dont la date de péremption est dépassée.
- Éliminez les échantillons et les déchets de l'essai conformément à la réglementation locale en matière de sécurité.

- Tous les instruments utilisés ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.

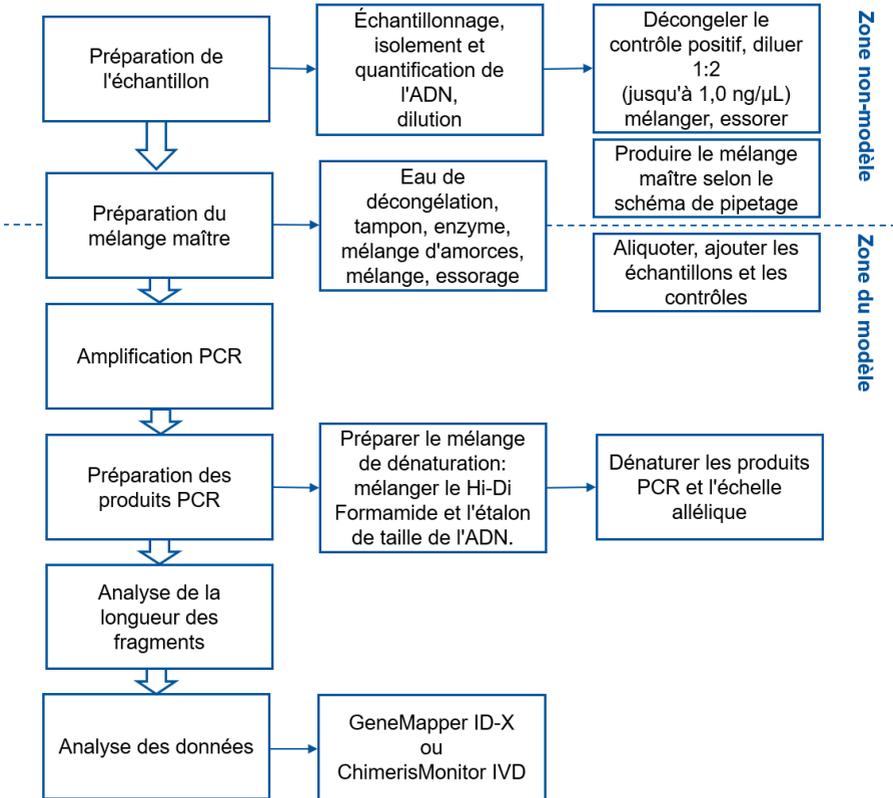
Note à l'attention de l'utilisateur

Tout problème survenant en rapport avec le produit doit être signalé par l'utilisateur au fabricant. Tout incident grave lié à ce kit doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente des États membres dans lesquels l'utilisateur et/ou le patient se trouvent.

Un résumé des caractéristiques de sécurité et des performances (SSP) est établi conformément à l'article 29 du règlement (UE) 2017/746 et destiné à fournir un accès, via la base de données EUDAMED, à un résumé actualisé des données relatives à la sécurité et aux performances du dispositif, dans le cas de ce produit, uniquement aux professionnels de laboratoire.

Procédure

Aperçu du flux de travail expérimental



Préparation des échantillons

Exigences relatives aux échantillons bruts

Prélevez au moins 200 μL d'échantillon de sang total veineux périphérique pour la procédure suivante.

La manipulation de l'échantillon brut (sang total veineux périphérique) doit suivre les recommandations de la directive MM05–A2 (2e édition) du Clinical

and Laboratory Standards Institute (CLSI) qui stipule que le sang total peut être conservé à température ambiante (entre 22 °C et 25 °C) pendant 24 heures maximum, ou entre 2 °C et 6 °C pendant 72 heures ou plus. De plus, il est recommandé d'utiliser des anticoagulants tels que l'EDTA, le citrate ou l'héparine pour le prélèvement de sang total.

REMARQUE



Un stockage prolongé du matériel brut peut entraîner une fragmentation du matériel génétique et, par conséquent, une qualité insuffisante de matériel. Cela peut détériorer le résultat de l'analyse, par exemple en raison de profils incomplets.

Extraction de l'ADN

Effectuez l'extraction et la purification de l'ADN à partir d'échantillons de sang total veineux périphérique conformément aux instructions du fabricant. Les kits suivants ont été vérifiés dans le cadre de l'évaluation des performances du produit :

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit
- Macherey-Nagel NucleoSpin® Dx Blood, mini kit certifié CE d'extraction d'ADN à partir de sang

REMARQUE



La contamination sanguine peut être détectée visuellement dans la réaction PCR ou dans l'ADN isolé par un changement de couleur orange. Si un changement de couleur est observé, nous recommandons de répéter l'isolement de l'ADN afin d'éviter toute interférence potentielle.

REMARQUE



Veillez à éliminer toute trace d'éthanol avant l'élution de l'acide nucléique. L'éthanol est un puissant inhibiteur de la PCR.

Quantification and dilution de l'ADN

Quantifiez la concentration d'ADN par spectroscopie UV/VIS à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop ou par spectroscopie de fluorescence à l'aide du Qubit™ Fluorometer.

Lorsque vous utilisez la spectrophotométrie, utilisez le tampon d'élution du kit d'extraction d'ADN pour mesurer le blanc. Le rapport A_{260}/A_{280} doit être compris entre 1,7 et 1,9, tandis que le rapport A_{260}/A_{230} doit être compris entre 1,8 et 2,3.

Pour la quantification fluorométrique de l'ADN, le Qubit™ Fluorometer avec soit le Qubit 1x dsDNA HS Assay-Kit, soit le Qubit dsDNA BR Kit peut être utilisé.

Pour une utilisation avec le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, diluez les échantillons d'ADN à une concentration optimale de 2,0 ng/μL. Préparez la dilution juste avant utilisation. Utilisez une Nuclease-Free Water comme diluant.

REMARQUE



La plage de dosage totale pour le kit est comprise entre 0,2 et 2,0 ng d'ADN par réaction, la **dose optimale étant de 2 ng d'ADN** par réaction dans des conditions standard pour une sensibilité maximale. Une dose inférieure à 0,2 ng peut entraîner des profils incomplets, une dose supérieure peut entraîner des pics de remontée.

Stockage de l'ADN

L'ADN doit être conservé non dilué à une température comprise entre -25 °C et -15 °C pour un stockage à long terme ou conformément aux instructions du fabricant du kit d'isolement de l'ADN.

Préparation du contrôle

Contrôle positif PC

Décongelez l'Control DNA XY82, homogénéisez-le par vortexage, puis centrifugez brièvement.

Diluez l'Control DNA XY82 à 1:2 de 2,0 ng/μL à 1,0 ng/μL à l'aide de l'Nuclease-Free Water.

Homogénéisez le PC dilué par un bref vortexage. Ensuite, centrifugez brièvement le PC dilué (pendant environ 10 s). Ne conservez pas le contrôle positif dilué.

REMARQUE



Utilisez toujours une dilution fraîche de l'Control DNA XY82.

Contrôle sans matrice NTC

Utilisez l'Nuclease-Free Water incluse dans le kit comme contrôle sans matrice (NTC) à la place d'un échantillon.

Préparation du mélange maître

Retirez les composants suivants du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit pour la préparation du mélange maître:

- Nuclease-Free Water (capuchon bleu clair)
- Reaction Mix A (capuchon violet)
- Mentype® DIPscreen Primer Mix (capuchon rouge)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (capuchon blanc)

Tous les composants congelés doivent être décongelés à température ambiante (entre 22 °C et 28 °C, pendant environ 30 minutes, à l'abri de la lumière) et homogénéisés en retournant les tubes ou en les agitant doucement au vortex. Ensuite, centrifugez brièvement les réactifs (pendant environ 10 s). Afin de respecter les principes de bonnes pratiques de

laboratoire, il est conseillé de conserver l'Multi Taq 2 DNA Polymerase dans un environnement frais aussi longtemps que possible (par exemple sur une grille de refroidissement) avant de préparer le mélange maître.

REMARQUE



Mélangez l'Multi Taq 2 DNA Polymerase en agitant rapidement pour une meilleure stabilité – **n'agitez pas l'enzyme au vortex.**

Préparez le mélange maître PCR conformément au Tableau 4 dans un tube à microcentrifugeuse de taille appropriée pour le nombre total d'échantillons à tester dans une zone propre dédiée. Incluez au moins un PC et un NTC dans votre calcul.

REMARQUE



En règle générale, si vous testez moins de 10 échantillons, utilisez suffisamment de mélange maître pour un échantillon supplémentaire. Si vous testez 10 échantillons ou plus, utilisez un volume de mélange maître de réactif excédentaire de +10 %.

Tableau 4 Préparation de la réaction du mélange maître PCR, * Le volume dépend de la concentration d'ADN. Si vous utilisez un volume plus important de matrice d'ADN, ajustez le volume d'Nuclease-Free Water. Le volume total de réaction (rxn) doit toujours être de 25,0 µL.

Composant	Volume		
	1 rxn	5 rxn	10 rxn
Nuclease-Free Water*	13,4 µL	67,5 µL	134,0 µL
Reaction Mix A	5,0 µL	25,0 µL	50,0 µL
Mentype® DIPscreen Primer Mix	5,0 µL	25,0 µL	50,0 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	0,6 µL	2,4 µL	6,0 µL
Matrice d'ADN ou échantillon de contrôle	1,0 µL*	5 x 1,0 µL*	10 x 1,0 µL*
Volume total	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

Mélangez le mélange maître en agitant doucement au vortex, puis centrifugez brièvement le mélange.

Aliquotez 24,0 µL du mélange maître PCR dans des tubes PCR de 200 µL préparés et centrifugez brièvement les tubes fermés.

Utilisation des matrices d'ADN et des contrôles

Ajoutez 1,0 µL des types d'échantillons suivants dans les tubes PCR préparés contenant le mélange maître PCR.

NTC: ajoutez 1,0 µL d'Nuclease-Free Water à la place d'un échantillon.

Échantillon: ajoutez 1,0 µL des échantillons d'ADNg préparés et dilués (2,0 ng/µL).

PC: ajoutez 1,0 µL de l'Control DNA XY82 préparé et dilué à 1:2 (1,0 ng/µL) à la place d'un échantillon.

REMARQUE



Tout d'abord, préparez le NTC afin d'éviter toute contamination du contrôle. Préparez le PC en dernier afin d'éviter toute contamination croisée des échantillons.

REMARQUE



Utilisez au moins un contrôle positif (PC) et un contrôle sans matrice (NTC) par série. Sinon, la série ne peut pas être validée.

Fermez tous les tubes PCR, agitez doucement au vortex et centrifugez.

Amplification de la PCR

Programmez le thermocycleur PCR avec le profil d'amplification suivant, en veillant à régler la vitesse de montée en température à 4 - 5 °C/s. Effectuez une PCR "hot start" afin d'activer la polymérase et d'empêcher la formation de produits d'amplification non spécifiques.

Tableau 5 Protocole PCR

Température	Temps	
94 °C	4 min	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	28 cycles
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	en permanence

REMARQUE

Si des thermocycleurs avec étapes de chauffage et de refroidissement réglables sont utilisés, la **montée en température doit être réglée à 4 - 5 °C/s** afin d'obtenir un équilibre optimal du signal.

REMARQUE

Pour obtenir des informations de base concernant la préparation, la programmation et la maintenance des différents instruments de PCR, veuillez vous reporter au manuel d'utilisation de l'instrument concerné.

REMARQUE

De très petites quantités d'ADN peuvent entraîner des pertes statistiques et des déséquilibres des pics. L'augmentation du nombre de cycles PCR augmente le risque de contamination croisée causée par des quantités minimales d'impuretés. De plus, des produits d'amplification non spécifiques pourraient apparaître.

Électrophorèse capillaire sur gel

Préparation des produits de PCR

Une fois la PCR terminée, retirez les échantillons du thermocycleur et centrifugez-les brièvement.

REMARQUE



Une fois la PCR terminée, les produits de PCR peuvent être conservés jusqu'à 4 semaines à une température comprise entre 2 °C et 8 °C ou à long terme à une température comprise entre -25 °C et -15 °C à l'abri de la lumière.

Décongelez, mélangez et centrifugez les réactifs:

- Hi-Di™ Formamide (non inclus dans le kit)
- Mentype® DIPscreen Allelic Ladder (capuchon vert)
- DNA Size Standard BTO (550) (capuchon orange)

Préparez le mélange de dénaturation décrit dans le [Tableau 6](#) et ajoutez une ou deux réactions pour compenser les variations de pipetage. Ajoutez une réaction supplémentaire pour l'échelle allélique.

Tableau 6 Mélange de dénaturation

Composant	Volume par réaction
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0,5 µL

Pipetez 12,0 µL du mélange de dénaturation dans les puits d'une plaque PCR (adaptée à une utilisation dans l'Genetic Analyzer).

Ajoutez soit 1,0 µL de produit de PCR, soit 1,0 µL d'Mentype® DIPscreen Allelic Ladder dans les puits. Scellez la plaque PCR avec une feuille d'aluminium appropriée, agitez au vortex et centrifugez brièvement la plaque.

REMARQUE



L'échelle allélique est utilisée pour déterminer correctement les fragments analysés lors de l'analyse des données. Lors de chaque analyse de la longueur des fragments, l'échelle allélique doit être analysée au moins une fois afin de garantir la bonne évaluation des données.

REMARQUE



Les capillaires de l'appareil d'électrophorèse sur gel ne doivent jamais être secs. Si les échantillons n'occupent pas toutes les positions capillaires, remplissez les puits supplémentaires de la plaque avec 12,0 µL de Hi-Di™ Formamide en fonction du nombre de capillaires.

Dénaturez les produits de PCR préparés dans un thermocycleur pendant 3 minutes à 95 °C, puis refroidissez les échantillons à 4 °C dans le thermocycleur. Centrifugez brièvement les échantillons avant l'analyse de la longueur des fragments.

Analyse de la longueur des fragments

Avant d'effectuer la première analyse de longueur des fragments, lancez Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE GmbH) pour effectuer un alignement spectral des colorants fluorescents utilisés pour le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

REMARQUE



Reportez-vous au mode d'emploi de Matrix Standard BT5 multi pour son installation. Il est disponible sur www.biotype.de/en/ifus ou sur demande via l'adresse e-mail support@biotype.de de BIOTYPE GmbH.

Une fois que Matrix Standard BT5 multi a été exécuté avec succès, importez les paramètres de l'instrument fournis pour l'3500 Series Genetic Analyzer comme décrit dans le [Tableau 7 \(www.biotype.de/en/template-files\)](#).

Tableau 7 Fichiers fournis pour les Genetic Analyzers

([www.biotype.de/en/template-files](#))

3500 Series Genetic Analyzers	
Instrument Protocol	<u>POP-4™, 36 cm capillary array:</u> DIPscreenVD_Instrument436.xml <u>POP-7™, 50 cm capillary array:</u> DIPscreenVD_Instrument750.xml
Size Standard Protocol	BTO_60-550_SizeStandard3500.xml
Sizecalling Protocol	BTO_60-550_Sizecalling.xml
Assay	<u>POP-4™, 36 cm capillary array:</u> DIPscreenVD_Assay436.xml <u>POP-7™, 50 cm capillary array:</u> DIPscreenVD_Assay750.xml

Les spécifications relatives au protocole requis pour les instruments sont décrites dans le [Tableau 8](#). Seuls les paramètres décrits doivent être ajustés, les autres paramètres doivent rester dans leur configuration par défaut. Suivez le mode d'emploi du fabricant pour régler les paramètres de fonctionnement spécifiques.

Tableau 8 Paramètres pour les modules d'exécution des différents appareils d'électrophorèse capillaire sur gel

	Injection Voltage [kV]	Injection Time [s]	Run Voltage [kV]	Run Time [s]
3500 Series Genetic Analyzers	3,0	8	36 cm capillary array: 15	1 560
			50 cm capillary array: 19.5	

Contrairement aux valeurs indiquées dans le [Tableau 8](#), la durée d'exécution peut être ajustée en fonction de la longueur du réseau capillaire utilisé, mais il est obligatoire d'analyser tous les fragments (60 à 550 pb) de la DNA Size Standard 550 (BTO).

Pour configurer un Size Standard protocol, les tailles suivantes pour la DNA Size Standard 550 (BTO) doivent être attribuées au panel orange:

60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 et 550 pb.

REMARQUE



BIOTYPE GmbH fournit des modèles spécifiques pour l'installation facile de paramètres d'exécution spécifiques pour l'analyse de la longueur des fragments, ainsi que des modèles d'analyse pour une configuration simple du logiciel GeneMapper™ ID-X. Ces modèles sont disponibles au téléchargement via: www.biotype.de/en/template-files.

Analyse des données

Procédure générale d'analyse des données

1. Vérifier la validité de l'exécution

- Voir le chapitre **Validation de l'exécution du flux de travail**



2. Vérifier la validité de l'échantillon

- Voir le chapitre **Analyse d'échantillons**



3. Évaluation des échantillons

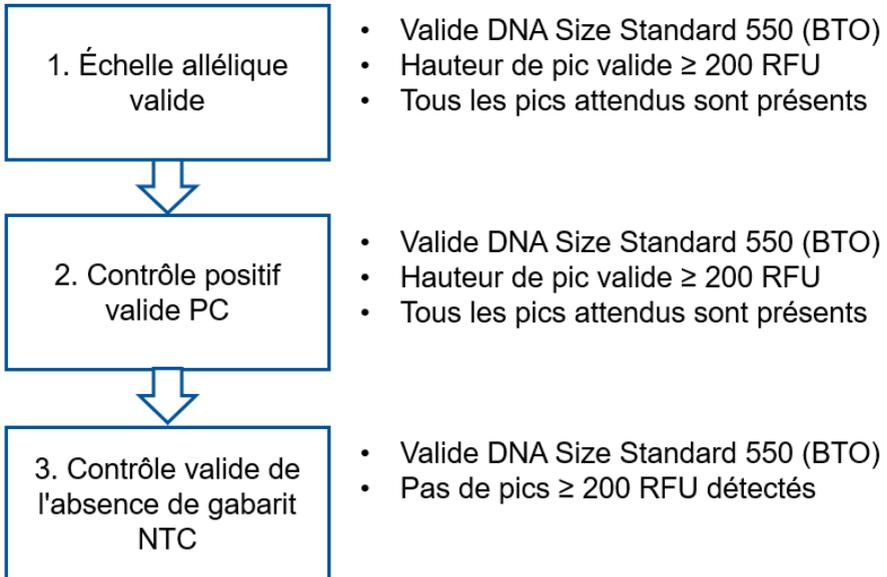
- Voir le chapitre **Analyse qualitative - identification des loci informatifs**
- Voir le chapitre **Analyse semi-quantitative - analyse du chimérisme**

REMARQUE



L'analyse des données doit être effectuée à l'aide du logiciel ChimerisMonitor IVD ou du logiciel GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Une évaluation manuelle des fichiers fsa ou de tout résultat fourni avec le logiciel de collecte de données sans l'une des deux options logicielles décrites pour l'analyse et l'évaluation des données n'est pas validée.

Validation de l'exécution du flux de travail



REMARQUE



La plage de mesure comprise entre 50 et 560 pb doit être analysée afin d'évaluer la validité.

DNA Size Standard 550 (BTO)

La détermination de la longueur exacte des produits amplifiés dépend du type de dispositif, des conditions d'électrophorèse et de la norme utilisée pour la taille de l'ADN. En raison de la complexité de certains loci, la détermination de la taille doit être basée sur des références réparties de manière uniforme.

Vérifiez la DNA Size Standard 550 (BTO) dans tous les échantillons selon les critères suivants :

- Présence de tous les fragments à : **60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525** et **550** pb

- Tous les fragments sont présents avec des hauteurs de pic supérieures à la valeur seuil ≥ 50 RFU
- Coefficient de détermination $R^2 > 0,995$.
- La hauteur maximale des fragments ne diminue pas de façon continue avec l'augmentation de la longueur des fragments.

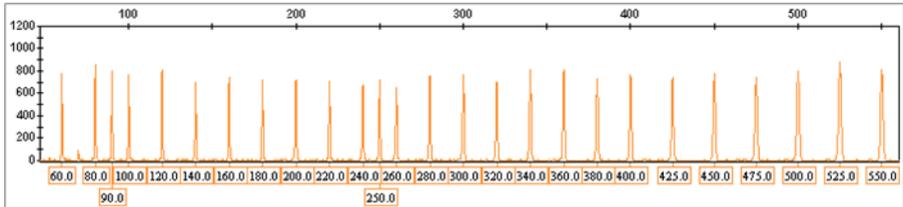


Figure 1 Électrophérogramme des fragments de la DNA Size Standard 550 (BTO), dont les longueurs sont exprimées en pb

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

Après avoir vérifié que la norme de taille est valide, vérifiez que tous les pics disponibles dans l'échelle allélique sont présents avec des hauteurs de pic supérieures à la valeur seuil ≥ 200 RFU.

REMARQUE



L'Mentype® DIPscreen Allelic Ladder comprend des fragments pour chaque allèle détectable. Comparez les allèles avec l'annexe [Tableau 20](#) et la [Figure 5](#).

Control DNA XY82 (PC)

Après avoir vérifié que la norme de la taille est valide, assurez-vous que le profil ADN complet de tous les pics spécifiques pour le PC est présent avec des hauteurs de pic ≥ 200 RFU (voir le [Tableau 9](#)). L'Control DNA XY82 est un contrôle de la PCR qualitatif permettant de garantir les performances générales du mélange maître.

L'Control DNA XY82 (voir l'annexe [Figure 6](#)), qui fait partie du kit de test, représente les allèles suivants :

Tableau 9 Génotype de l'Control DNA XY82, - = délétion, + = insertion

Locus	Control DNA XY82	Locus	Control DNA XY82
Panel FAM (canal bleu)		Panel BTG (canal vert)	
Amelogenin	X/Y	HLD91	+/+
HLD106	+/+	HLD23	-/+
HLD70	-/+	HLD88	+/+
HLD84	+/+	HLD101	-/+
HLD103	-/+	HLD67	-/+
HLD104	-/+	HLD301	-/+
HLD116	-/+	HLD53	+/+
HLD112	-/+	HLD97	-/+
HLD307	+/+	HLD152	-/+
HLD310	-/+	HLD128	-/+
HLD110	-/+	HLD134	+/+
HLD133	-/+	HLD305	+/+
HLD79	+/+	Panel BTY (canal jaune)	
HLD105	-/-	HLD48	-/-
HLD140	-/+	HLD114	-/-
HLD163	-/+	HLD304	-/+
		HLD131	+/+
		HLD38	+/+
		HLD82	+/+

Contrôle sans matrice NTC

Après avoir vérifié que la norme de taille est valide, vérifiez qu'aucun pic supérieur à la valeur seuil ≥ 200 RFU n'est détecté dans la plage de classification du NTC (voir l'annexe [Figure 6](#)).

REMARQUE



En utilisant ChimerisMonitor IVD ou GeneMapper™ ID-X avec les fichiers modèles fournis pour la Analysis Method, les pics < 200 RFU ne sont pas automatiquement attribués au nom de l'allèle, ce qui vous aide à évaluer facilement les résultats.

REMARQUE



Des artefacts tels que de petites taches de colorant peuvent apparaître de manière plus prononcée dans le NTC. En raison de la large base du pic, de sa forme anormale et de l'absence d'attribution, il est possible de le différencier des pics d'amplicons.

Analyse des échantillons

Analyse des données du flux de travail

1. Valide DNA Size Standard 550 (BTO)

- Voir chapitre suivant



2. Hauteurs de crête valables

- Échantillons de génotypage: tous les pics \geq 200 RFU
- Échantillons de contrôle: pics non informatifs \geq 200 RFU
- Pas de pics d'attraction



3. Nombre adéquat de pics par locus

- Échantillons de génotypage: min. 1, max. 2 pics par locus
- Échantillons de contrôle: min. 1, max. 2 pics par locus



4. Plausibilité

- Échantillons de contrôle: seuls les pics d'allèles présents également dans l'échantillon du receveur et du donneur sont présents (pas de pics supplémentaires).

À l'aide du logiciel ChimerisMonitor IVD, les étapes de validation décrites pour la série et les échantillons sont mises en œuvre automatiquement.

En utilisant le logiciel GeneMapper™ ID-X avec les modèles spécifiques fournis par BIOTYPE GmbH, la validation de base est effectuée automatiquement.

Analyse qualitative - identification des loci informatifs

Dans la section suivante, l'identification et la différenciation des loci spécifiques au receveur sont détaillées. Par conséquent, les loci spécifiques au donneur sont définis comme non informatifs. L'identification des loci informatifs est réalisée à partir des données du receveur et du donneur avant la transplantation. Pour voir des exemples, consultez le [Tableau 21](#), le [Tableau 22](#) dans l'annexe.

À l'aide de ChimerisMonitor IVD, l'identification des loci informatifs est prise en charge par le logiciel.

Loci informatifs: un allèle présent dans l'échantillon du receveur ne peut être détecté dans l'échantillon du donneur.

Loci non informatifs: loci où le ou les pics spécifiques au receveur chevauchent le ou les pics spécifiques au donneur, ou loci spécifiques au donneur.

Analyse semi-quantitative – analyse du chimérisme

L'analyse semi-quantitative du chimérisme est réalisée comme décrit dans la littérature, par exemple Clark et al. (2015) [1] ou Nollet et al. (2001) [2]. Les formules utilisées pour la quantification dépendent de la constellation allélique dans le locus et sont indiquées dans le [Tableau 10](#) suivant (adapté de Clark et al.). La valeur de chimérisme est calculée pour chaque locus informatif précédemment sélectionné. Ensuite, la moyenne de toutes les valeurs du chimérisme spécifiques au locus est calculée.

REMARQUE



Il est recommandé d'évaluer chaque SD_{Marker} afin d'identifier les valeurs aberrantes. Le SD_{Marker} pour les échantillons à faible chimérisme mixte (< 5 % MC) ne doit pas dépasser 4 %. Pour un chimérisme mixte moyen à élevé (> 5 % MC), le SD_{Marker} ne doit pas dépasser 10 %. Si le SD_{Marker} dépasse les limites, il est

REMARQUE

recommandé de réanalyser les valeurs du MC des marqueurs choisis afin de détecter les valeurs aberrantes.

Tableau 10 Analyse semi-quantitative du chimérisme (adapté de Clark et al. [1])

Scénario 1	Scénario 2
<p>aucun allèle partagé: le receveur est homozygote, le donneur est homozygote, aucun pic n'est partagé</p>	<p>un allèle partagé (homozygote): le receveur est hétérozygote, le donneur est homozygote, un pic est partagé</p>
<p>Ratio du receveur:</p> $\% \text{ de chimérisme} = \frac{A}{A+B} \times 100\%$	<p>Ratio du receveur:</p> $\% \text{ de chimérisme} = \frac{A}{\left(\frac{B-A}{2}\right) + A} \times 100\%$

Analyse des données avec ChimerisMonitor IVD

ChimerisMonitor IVD est un logiciel avancé pour l'analyse automatisée des données, l'évaluation de la série et le calcul du chimérisme. Le système **Patient Management** intégré permet de surveiller la cinétique du chimérisme dans des rapports haute résolution, mais aussi sous forme de graphiques et de tableaux.

Pour obtenir des instructions générales sur l'analyse des échantillons, consultez le mode d'emploi du logiciel ChimerisMonitor IVD.

Tous les modèles d'analyse requis sont inclus dans le système **Test Kit Management** de ChimerisMonitor. Ces derniers contiennent des méthodes d'analyse ainsi que les modèles de Bin et de Panel associés. Le logiciel effectue une évaluation générale et intégrée de l'exécution pendant l'importation des lots, conformément au chapitre Validation de l'exécution du flux de travail. Consultez le Tableau 11 pour obtenir une description générale du flux de travail d'analyse des données de ChimerisMonitor.

REMARQUE



L'analyse des données doit être effectuée soit avec logiciel ChimerisMonitor IVD ou le logiciel GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Une évaluation manuelle des fichiers fsa ou de tout résultat fourni avec le logiciel de collecte de données sans l'une des deux options logicielles décrites pour l'analyse et l'évaluation des données n'est pas validée.

Tableau 11 Flux de travail d'analyse du chimérisme avec ChimerisMonitor

N°	Icône	Étape de travail
1		Importation d'échantillons
		Create new patient. Une base de données de tous les patients créés est représentée dans le système Gestion des patients
		Batch Import: - Sélectionnez le kit de test Biotype Mentype DIPscreen Tous les seuils pour l'évaluation correcte de la série et de

N°	Icône	Étape de travail
	 	<p>l'échantillon sont associés à la méthode d'analyse correspondante.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Importez une série contenant les fichiers fsa de l'échelle allélique, le contrôle positif, le contrôle sans matrice et les échantillons. - Sélectionnez manuellement les types d'échantillons. (indispensable pour une attribution correcte des pics et le calcul du chimérisme) - L'évaluation générale de la série et des échantillons est réalisée par le logiciel <p>Ouvrez la Batch Import View</p> <p>Assign Sample: Sélectionnez un échantillon et attribuez-le au patient.</p>
2	  	<p>Contrôles de vérification – ChimerisMonitor effectue une évaluation intégrée de la qualité ainsi qu'une évaluation de la série et des échantillons</p> <p>Vérifiez l'Allelic Ladder Electropherogram et la Size Calling Regression</p> <p>Les avertissements de qualité possibles s'affichent:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sous l'onglet Evaluation of Allelic Ladders pendant l'importation des lots - Sous l'onglet FSA Import Warnings dans l'éditeur de patients <p>Vérifiez l'Positive Control Electropherogram et la Size Calling Regression</p> <p>L'Evaluation of Positive and No Template Controls pendant l'importation des lots affiche les potentiels avertissements de qualité.</p> <p>Vérifiez l'No Template Control Electropherogram et la Size Calling Regression</p> <p>L'Evaluation of Positive and No Template Controls pendant l'importation des lots affiche les potentiels avertissements de qualité</p>
3	 	<p>Évaluation des échantillons</p> <p>Vérifiez l'Sample Electropherogram</p> <p>Une attribution correcte des pics est essentielle pour une définition précise des marqueurs informatifs et un calcul fiable du chimérisme.</p> <p>Le contrôle de la Sample Quality pendant l'importation des lots affiche les potentiels avertissements de qualité</p> <p>Vérifiez la taille de l'échantillon en cas de régression.</p> <p>Le contrôle de la Sample Quality pendant l'importation des lots affiche les potentiels avertissements de qualité</p>

N°	Icône	Étape de travail
4		Définition des marqueurs informatifs
		Create a new transplantation: des marqueurs prédéfinis peuvent être sélectionnés pour la surveillance des patients
5		Analyse du chimérisme
		Calculate Chimerism: Consultez les marqueurs présélectionnés pour l'analyse du chimérisme et effectuez le calcul du chimérisme (chimérisme à marqueur unique, chimérisme total et écart-type)
6		Rapport
		Create Report: Les valeurs individuelles et la cinétique du chimérisme sont affichées au fil du temps (tableau et graphique, format de fichier pdf ou csv)
7		Créez un système alimenté par une base de données pour Patient Management

Analyse des données avec GeneMapper™ ID-X

Préparation du logiciel GeneMapper™ ID-X

Pour obtenir des instructions générales sur l'application et l'analyse des échantillons avec ce logiciel, consultez le manuel d'utilisation du logiciel GeneMapper™ ID-X.

L'attribution des allèles doit être effectuée à l'aide du logiciel d'analyse GeneMapper™ ID-X en combinaison avec les fichiers modèles du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit de BIOTYPE GmbH. Les fichiers modèles BIOTYPE (voir le [Tableau 12](#)) sont disponibles au téléchargement sur notre page d'accueil (<https://www.biotype.de/en/template-files>) ou sur demande via l'adresse e-mail support@biotype.de. Le flux de travail d'analyse du chimérisme à l'aide du logiciel GeneMapper™ ID-X est présenté sur le [Tableau 13](#).

Tableau 12 Modèles BIOTYPE GmbH pour le logiciel GeneMapper™ ID-X spécifiques à l'application # POP-4™ ou § POP-7™

Modèle	Nom du modèle	
Panels*	DIPscreenIVD_Panel4_v1x [#] DIPscreenIVD_Panel7_v1x [§]	ou des versions ultérieures
Bin Sets*	DIPscreenIVD_Bins4_v1x [#] DIPscreenIVD_Bins7_v1x [§]	ou des versions ultérieures
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	ou des versions ultérieures
Analysis Method*	DIPscreenIVD_Analysis4_v1x [#] DIPscreenIVD_Analysis7_v1x [§]	ou des versions ultérieures
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles Table for 10 Alleles	

*Ces modèles doivent toujours être utilisés pour l'analyse des données. Les autres fichiers modèles sont facultatifs.

REMARQUE

L'importation et l'appel d'allèles à l'aide des fichiers modèles fournis ne sont garantis que si le logiciel GeneMapper™ ID-X est utilisé. Lorsque le logiciel GeneMapper™ est utilisé, vous pouvez rencontrer des problèmes d'importation avec certains fichiers modèles. Vous devrez peut-être ajuster les panels et les classifications à l'aide d'une ou plusieurs séries de l'échelle allélique sur votre configuration d'instrument spécifique. Contactez-nous pour obtenir de l'aide (support@biotype.de).

Tableau 13 Flux de travail d'analyse du chimérisme avec GeneMapper™ ID-X

N°	Icône	Étape de travail
1		Préparation du logiciel
		Panel Manager Importez les fichiers modèles fournis pour les éléments Panel, Bins
		GeneMapper™ ID-X Manager Importez le modèle fourni pour la Analysis Method et la Size Standard
2		Importation d'échantillons

N°	Icône	Étape de travail										
		Add Samples to Project - recherchez le dossier de la série, sélectionnez-le et Add to List → Add										
3		Analyse des échantillons										
		Sélectionnez les propriétés suivantes dans les colonnes appropriées de la feuille modèle, puis choisissez Analyze .										
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nom de la colonne</th> <th>Sélection</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sample Type</td> <td>Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control ou Sample</td> </tr> <tr> <td>Analysis Method</td> <td>Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Analysis_v1x</td> </tr> <tr> <td>Panel</td> <td>Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Panel_v1x</td> </tr> <tr> <td>Size Standard</td> <td>Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé BTO_60-550_v1x</td> </tr> </tbody> </table>	Nom de la colonne	Sélection	Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control ou Sample	Analysis Method	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Analysis_v1x	Panel	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Panel_v1x	Size Standard	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé BTO_60-550_v1x
Nom de la colonne	Sélection											
Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control ou Sample											
Analysis Method	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Analysis_v1x											
Panel	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Panel_v1x											
Size Standard	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé BTO_60-550_v1x											
4		Contrôles de vérification										
		Validité des contrôles de vérification (Allelic Ladder, Positive Control, No Template Control)										
		Si les hauteurs de pics sont suffisantes, l'attribution est effectuée conformément aux spécifications de la Analysis Method										
5		Évaluation des échantillons										
		Vérifiez la validité des échantillons.										
		Si les hauteurs de pics sont suffisantes, l'attribution est effectuée conformément aux spécifications de la Analysis Method										
		Si des pics ne sont pas attribués alors que des hauteurs suffisantes sont atteintes, une attribution manuelle est possible. Vérifiez la plausibilité de toutes les affectations de pics.										
6		Définition des marqueurs informatifs										

N°	Icône	Étape de travail
		Comparez les génotypes du receveur et du donneur, puis identifiez manuellement les marqueurs informatifs (voir annexe Exemples d'évaluation qualitative des loci)
7		Analyse du chimérisme
		Exportez le Sizing Table et calculez les valeurs du chimérisme conformément au Tableau 10 - voir chapitre Analyse semi-quantitative – analyse du chimérisme

REMARQUE

i

À l'aide des fichiers modèles fournis pour les éléments Analysis Method, Bins, Panels et en sélectionnant le type d'échantillon correspondant, la validité de ces échantillons est automatiquement vérifiée par le logiciel. Les indicateurs de contrôle qualité SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) doivent être des cases vertes pour indiquer que la validité est acceptée.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
						

REMARQUE

i

Utilisez l'Size Match Editor de GeneMapper™ ID-X pour évaluer la norme de la taille. Si l'appel automatique des fragments a échoué, les triplets 80 / 90 / 100 pb et 240 / 250 / 260 pb peuvent être utilisés pour orienter l'affectation manuelle des pics.

Dépannage

L'analyse post-PCR et l'attribution automatique des allèles à l'aide d'un logiciel d'analyse adapté garantissent une discrimination précise et fiable des allèles.

Un calcul automatisé du ratio ADN donneur/receveur, ainsi que des écarts-types et des limites de détection, peut être obtenu directement à partir des données brutes d'une analyse de taille de fragments.

Si les résultats obtenus avec le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit doivent être harmonisés avec les résultats des analyses cytologiques, assurez-vous que ces dernières ont été réalisées sur au moins 500 leucocytes.

Pics de remontée

Des pics de remontée peuvent apparaître si les hauteurs des pics se situent en dehors de la plage de détection linéaire ou si une matrice incorrecte a été appliquée. Ils peuvent apparaître à des positions correspondant à des pics spécifiques dans d'autres panels de couleurs, généralement avec des intensités de signal plus faibles. Pour une observation régulière, envisagez de répéter la génération de la matrice et vérifiez la surcharge en ADN.

Ajout de nucléotides indépendant de la matrice

En raison de son activité de transférase terminale, l'Multi Taq 2 DNA Polymerase a tendance à ajouter un radical adénosine à l'extrémité 3' des fragments d'ADN amplifiés. Le pic de l'artefact est plus court d'une base que prévu (pics de -1 pb). Toutes les amorces BIOTYPE sont conçues pour minimiser ces artefacts. La formation d'artefacts est encore réduite par l'étape finale d'extension du protocole PCR à 68 °C pendant 60 minutes. La hauteur du pic de l'artefact est corrélée à la quantité d'ADN. Les laboratoires doivent définir leurs propres limites pour l'analyse des pics.

Artefacts

La température ambiante peut influencer les performances des produits de PCR sur les instruments multi-capillaires. Des pics secondaires ou fractionnés peuvent alors apparaître. En outre, l'attribution automatisée pourrait être influencée dans certains cas. Si ces effets se produisent, nous recommandons d'injecter à nouveau l'échantillon à une température ambiante plus élevée et, éventuellement, d'utiliser plusieurs échantillons d'échelle allélique par série.

Des artefacts tels que de petites taches de colorant peuvent également apparaître dans les échantillons et de manière encore plus prononcée dans le NTC. En raison de la large base du pic, de sa forme anormale et de l'absence d'attribution, il est possible de le différencier des pics d'amplicons.

Écarts de pipetage

L'analyse de robustesse du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a révélé que le kit est robuste face à des écarts mineurs par rapport au protocole décrit (+/- 10 % d'écart). Un écart moyen (+/- 20 %) par rapport au protocole expérimental décrit peut être plus critique pour l'analyse du chimérisme mixte (en particulier à de faibles pourcentages de chimérisme). Il est essentiel d'accorder une attention particulière au tampon PCR du Reaction Mix A. Un écart de - 20 % dans ce tampon peut entraîner une réduction significative de la hauteur du signal, voire rendre les marqueurs indétectables. Pour minimiser les écarts, nous recommandons d'utiliser des pipettes calibrées, de pipeter avec précision et de bien mélanger.

Valeurs aberrantes

Il est recommandé d'évaluer l'écart-type dans les marqueurs (SD_{Marker}) afin d'identifier les valeurs aberrantes. Si le SD_{Marker} pour les échantillons à chimérisme mixte faible ($MC < 5\%$) dépasse les 4 % et pour les échantillons à chimérisme mixte moyen à élevé ($MC > 5\%$) dépasse les 10 %, envisagez de réanalyser les valeurs du MC sans cette valeur aberrante spécifique.

Influence des polymères

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a été validé et certifié pour l'analyse sur les polymères POP-4™ et POP-7™.

Lors de l'utilisation du polymère POP-7™, des taches de colorant peuvent apparaître dans la partie avant des électrophérogrammes. En particulier, des taches de colorant ont été observées jusqu'à une taille de 110 pb dans le canal bleu et pourraient affecter le locus HLD106. Vérifiez les électrophérogrammes pour détecter de tels effets avant d'effectuer l'analyse du chimérisme.

L'utilisation d'autres polymères (par exemple POP-6™) peut influencer le comportement de certains produits de PCR lors de la réaction. De plus, le bruit de fond peut augmenter en raison du comportement différent des colorants fluorescents libres.

Évaluation des performances

Spécificité analytique

Nous avons testé l'appel automatique des allèles à l'aide de l'échelle allélique et la concordance de l'attribution des allèles par rapport au pré-typage des ADN testés à l'aide d'autres méthodes (autres kits de PCR) à l'aide du logiciel Genemapper™ ID-X.

Nous avons évalué quatre-vingts échantillons d'ADN pré-caractérisés, analysés à l'aide du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Des profils complets avec des hauteurs de pic ≥ 200 RFU ont été détectés. Après avoir déterminé les paramètres de dispositifs spécifiques au test, le génotype correct a été attribué à tous les échantillons d'ADN pour tous les systèmes DIP et le marqueur amélogénine. De plus, nous avons évalué la spécificité des amorces du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Aucun produit de PCR mal amorcé non spécifique n'a été observé, ce qui garantit la spécificité de l'amorce du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit.

Interférents et réactions croisées

Les interférents susceptibles d'influencer les résultats de la procédure de mesure ont été évalués conformément aux recommandations des directives CLSI EP07 (3e édition) et EP37 (1re édition). Pour le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, les interférents endogènes et exogènes ont été déterminés, leur concentration maximale attendue (C_{max}) dans la réaction PCR, telle que suggérée dans les directives, a été testée et, en cas d'interférence, d'autres concentrations ont été testées afin de déterminer la concentration à laquelle aucune interférence n'est détectable.

Les résultats ont révélé un effet interférant de l'interférent endogène présent dans le sang testé à $2,57E-03$ % v/v dans la réaction PCR sur la mesure du profil complet de l'ADN d'un seul génotype. De plus, des écarts par rapport au groupe non traité ont été observés pour les échantillons de chimérisme mixte mesurés à un MC de 2 %, 5 % et 30 %. Les résultats se situaient en dehors des limites de précision et indiquaient donc une interférence sur la réaction PCR. Cependant, la contamination sanguine peut être détectée visuellement dans la réaction PCR ou dans la suspension d'ADN isolé par

un changement de couleur orange. Les utilisateurs professionnels formés en laboratoire doivent vérifier s'il y a un changement de couleur et répéter l'isolement de l'ADN afin d'éviter toute interférence.

Pour les interférents exogènes, l'EDTA, le citrate de sodium, l'éthanol, l'acide acétylsalicylique, le métopropramide et la cyclosporine n'ont révélé aucun effet d'interférence à leur C_{max} respective, où la mesure du profil complet de l'ADN du génotype unique XY1726 a pu être réalisée et les écarts par rapport au groupe non traité observés pour les échantillons de chimérisme mixte mesurés à un MC de 2 %, 5 % et 30 % étaient dans les limites de précision.

En ce qui concerne les interférents exogènes, une interférence avec l'héparine, la protéinase K et le méthotrexate a été observée à la C_{max} recommandée par la directive CLSI EP37 (1ère édition). D'autres dilutions ont été testées jusqu'à ce qu'aucune interférence ne soit détectable. Pour l'héparine $2,36E-02$ mg/dl, pour la protéinase K $3,22E-06$ % v/v et pour le méthotrexate 13,6 mg/dl, aucune interférence n'a été observée.

Les anticoagulants sanguins EDTA, citrate de sodium et héparine ont également été testés avec les kits d'isolement recommandés. Aucun impact sur les performances analytiques n'a été détecté. Nous pensons que le flux de travail des kits d'isolement permettra d'éliminer les substances interférentes testées provenant des anticoagulants et des réactifs d'isolement de l'ADN. Quant à l'agent chimiothérapeutique méthotrexate, il n'a montré aucune interférence à la concentration testée par rapport à son blanc de référence.

Tableau 14 Concentrations testées d'interférents endogènes et exogènes

Type d'interférent	Catégorie	Interférent	Concentration sans interférence
Endogène	Composants de sang total	Sang total	non testé
Exogène	Anticoagulants	EDTA	0,099 mg/dl
		Sodium, citrate	8,23E- 05 % v/v dans la réaction PCR
		Héparine	2,36E- 02 mg/dl
	Agents d'isolement de l'ADN	Protéinase K.	3,22E- 06 % v/v dans la réaction PCR
		Éthanol	2,70E- 03 % v/v dans la réaction PCR
	Analgésiques et antipyrétiques	Aspirine (acide acétylsalicylique)	3 mg/dl
	Agent antiémétique	Métoclopramide	0,225 mg/dl
	Agent chimiothérapeutique	Méthotrexate	13,6 mg/dl
Agent immunosuppresseur	Cyclosporine	0,18 mg/dl	

Sensibilité analytique

L'ADN génomique humain à génotype unique est mesurable dans une plage comprise entre 0,125 ng et 2,00 ng. Dans cette plage, les profils complets de tous les marqueurs DIP et de l'amélogénine peuvent être mesurés sans défauts. Nous recommandons 1,00 ng comme quantité optimale d'ADN à génotype unique pour une analyse complète acceptable tout en réduisant la consommation de matériel. Pour détecter le chimérisme mixte avec une sensibilité optimale, nous avons testé différentes quantités de dosage. Afin d'éviter une sensibilité limitée pour les faibles quantités de dosage, nous

avons défini 2,00 ng d'ADN comme quantité de dosage optimale pour la détection du chimérisme mixte.

La linéarité a été évaluée sur la base de la directive CLSI - EP06Ed2 (2e édition). La linéarité a été testée à l'aide de six échantillons mixtes de chimérisme différents. Chaque échantillon de chimérisme mixte a été dilué afin de couvrir le chimérisme du receveur de 1 % à 90 % (1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %). L'écart acceptable par rapport à la linéarité (ADL) a été défini à 4 % pour les échantillons présentant jusqu'à 10 % de chimérisme du receveur afin de n'autoriser que des écarts mineurs dans cette plage. Pour un chimérisme du receveur > 10 %, l'ADL a été fixé à 10 % afin de permettre des écarts moyens par rapport à la linéarité. Les valeurs attendues et prévues étaient inférieures à l'ADL pour tous les échantillons, confirmant ainsi la linéarité pour la plage de mesure du chimérisme testée.

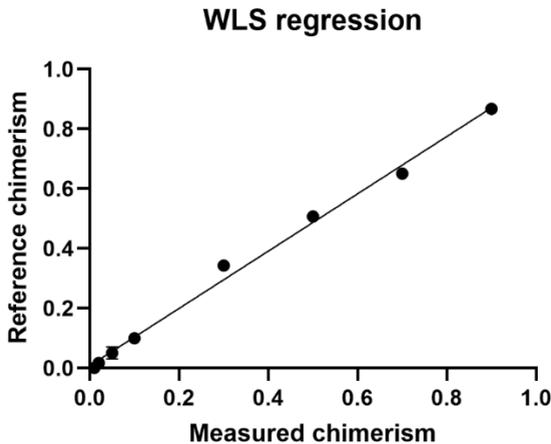


Figure 2 Exemple de régression pondérée de différentes concentrations de chimérisme pour un mélange chimérique 82+1180.

La régression a montré un coefficient de détermination de 0,994, confirmant un degré élevé de linéarité entre les valeurs mesurées et les valeurs attendues sur toute la plage d'essai de 1 % à 90 % de chimérisme du receveur.

La limite de blanc (LoB) a été testée sur 31 ADN à génotype unique, sur trois jours différents, avec deux lots de kits différents. La LoB pour le chimérisme mixte a été calculée à l'aide de l'approche non paramétrique de la directive CLSI - EP17-A2 ($\alpha = 0,05$, 2e édition). Seuls les marqueurs informatifs ont été analysés. Le résultat a confirmé une LOB de 0,49 %.

En utilisant une quantité de dosage d'ADN de 2,00 ng, nous avons testé trois échantillons de chimérisme mixte différents avec des concentrations comprises entre 0,50 % et 3,00 %. Tous les échantillons ont été testés avec deux lots de kits différents. En utilisant l'analyse Probit-(directive CLSI - EP17-A2, 2e édition) avec un niveau de confiance de 95 %, la limite de détection (LoD) obtenue pour le lot 1 était de 1,36 % et de 1,39 % pour le lot 3. La LoD obtenue à consigner dans le rapport est de 1,39 % de chimérisme mixte.

Tableau 15 LoD pour le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit avec utilisation de marqueurs informatifs

Lot	LoD (% de chimérisme mixte)	N _{total}
Lot 1	1,36 %	252
Lot 3	1,39 %	252

L'objectif de précision pour la limite de quantification a été défini conformément à la directive CLSI - EP17-A2 (2e édition). Pour la détection du chimérisme à la LoD, nous avons défini l'objectif de précision à l'aide du modèle Westgard ($TE = |biais| + 1,96 s$, (Westgard et al. 1974 [3])) ainsi que le biais et la précision de l'essai. L'écart type combiné obtenu, soit 0,45 %, était inférieur à l'objectif de précision basé sur l'ET de 1,77 %, confirmant ainsi une précision acceptable à la LoD.

Précision

L'imprécision et le biais peuvent varier selon les différents teneurs du chimérisme. Nous avons conclu qu'il fallait diviser la plage de chimérisme mixte (MC) en trois intervalles également indiqués par Pettersson et al. (2021) afin d'établir des critères d'acceptation adaptés à chaque intervalle. Les intervalles sont les suivants :

- MC faible avec une teneur < 5 % en deuxième génotype
- MC moyen avec une teneur comprise entre 5 et 20 % en deuxième génotype
- MC élevé avec une teneur > 20 % en deuxième génotype

L'analyse de la précision a été évaluée sur la base de la directive CLSI – EP21Ed2E (2e édition). Le biais mesuré par rapport au matériel de référence et l'imprécision (reproductibilité) mesurée dans une étude multisite ont été utilisés pour calculer une valeur sigma basée sur la métrique Sigma (Westgard et al. 2018 [3]). L'Total Error acceptable a été établie sur la base des estimations du biais de l'étude de linéarité et de l'imprécision consignée dans les rapports pour les essais PCR basés sur les STR pour l'analyse du chimérisme (Pettersson et al. 2021 [4]). Les valeurs sigma obtenues ont montré une bonne précision pour l'intervalle de MC faible et moyen et une excellente précision pour l'intervalle de MC élevé.

Tableau 16 Valeurs Sigma pour le chimérisme mixte

Échantillon	Valeur Sigma
Chimérisme mixte à 2 %	3,08
Chimérisme mixte à 5 %	3,05
Chimérisme mixte à 30 %	4,99

Fidélité

L'évaluation des biais s'est appuyée sur des documents de référence provenant de trois fournisseurs d'essais interlaboratoires différents (3 programmes de External Quality Control différents). Le biais a été calculé pour la différence entre le résultat du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit et la valeur de référence :

$$\Delta MC = MC \text{ de référence} - MC \text{ Mentype DIPscreen}$$

Le calcul du biais est basé sur la directive CLSI - EP09Ed3cE (3e édition) et utilise la moyenne des valeurs ΔMC , car la distribution normale a été prouvée (test de normalité Shapiro-Wilk, $\alpha = 0,05$). Conformément aux valeurs de référence, les échantillons ont été répartis dans les trois sous-intervalles pour le MC, comme décrit ci-dessus (chapitre Précision). Le biais obtenu variait entre -0,68 et 0,74.

Tableau 17 Biais (moyenne de Δ MC) pour un MC faible, moyen et élevé

	MC faible (< 5 %)	MC moyen (5 à 20 %)	MC élevé (> 20 %)
Biais (moyenne de Δ MC)	0,54	0,74	-0,68

Outre l'évaluation des biais, nous avons comparé le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit à une méthode de référence. La méthode de référence du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit basé sur la PCR analyse le polymorphisme des séquences courtes répétées en tandem (STR) afin de distinguer deux individus (génotypes). Les deux méthodes ont été évaluées à partir de 97 échantillons provenant de patients présentant différents teneurs de chimérisme mixte. Le coefficient de détermination obtenu de 0,9963 a confirmé la forte corrélation entre les deux méthodes.

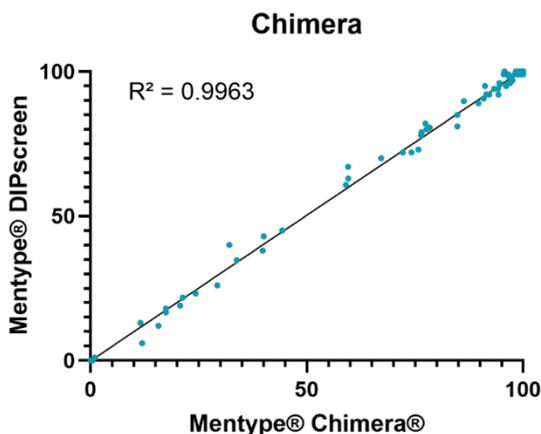


Figure 3 Comparaison des méthodes de référence du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit et du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit. La régression linéaire à droite montre une corrélation acceptable avec un coefficient de détermination de 0,9963.

Précision

Nous avons évalué la répétabilité et la reproductibilité de l'essai sur la base de la norme ISO 5725-2:2022-05 et de la directive CLSI - EP05 (3e édition). Des échantillons de chimérisme mixte couvrant la plage de mesure du chimérisme (2 %, 5 %, 30 %, 70 %) ont été évalués dans le cadre d'une étude multisite 5 x 5 x 3 (jour x réplique x site). La répétabilité obtenue pour le chimérisme mixte variait entre 0,60 % et 1,68 % d'écart-type (SD) du chimérisme mixte et la reproductibilité variait entre 0,63 % et 1,75 % d'SD du chimérisme mixte.

Limite de l'essai

Nous avons évalué la limite de l'essai pour le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit en fonction du calcul de la fréquence allélique des différents marqueurs amplifiés. Des échantillons provenant de 81 individus ont été analysés à l'aide du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Les fréquences alléliques obtenues ont été utilisées pour calculer des paramètres de discrimination STR spécifiques également pertinents pour l'analyse du chimérisme, tels que le contenu en informations polymorphes (PIC), l'hétérozygotie attendue (HET) et le pouvoir de discrimination (PD) qui démontre la capacité d'un marqueur génétique ou d'un ensemble de marqueurs à distinguer différents individus au sein d'une population. Les valeurs du PIC et de l'HET mettent en évidence le polymorphisme élevé des INDELS et un taux élevé d'hétérozygotie pour le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Le PD pour tous les marqueurs DIP varie entre 0,5146 et 0,6581, ce qui permet techniquement de distinguer deux individus sur la base d'au moins un marqueur, mais le PD augmente lorsque plusieurs marqueurs sont utilisés en combinaison.

Tableau 18 Probabilité de discrimination de tous les marqueurs inclus dans le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Les valeurs du PIC, PD et de l'HET ont été calculées pour chaque marqueur sur la base d'une analyse portant sur 81 individus.

Marqueur	PIC	HET	PD
AM	0,3384	0,4341	0,4664
HLD106	0,3066	0,3804	0,5301
HLD70	0,3744	0,5019	0,6572

Marqueur	PIC	HET	PD
HLD84	0,3695	0,4921	0,6328
HLD103	0,3703	0,4938	0,6389
HLD104	0,3651	0,4835	0,6389
HLD116	0,3736	0,5003	0,5322
HLD112	0,3725	0,4982	0,5877
HLD307	0,3736	0,5003	0,6054
HLD310	0,3559	0,4660	0,6152
HLD110	0,3685	0,4901	0,6261
HLD133	0,3703	0,4938	0,6462
HLD79	0,3174	0,3981	0,5603
HLD105	0,3736	0,5003	0,6191
HLD140	0,3623	0,4783	0,5972
HLD163	0,3703	0,4938	0,6060
HLD91	0,3712	0,4954	0,5274
HLD23	0,3559	0,4660	0,5850
HLD88	0,3719	0,4969	0,5597
HLD101	0,3740	0,5012	0,6261
HLD67	0,3384	0,4341	0,5834
HLD301	0,3736	0,5003	0,6054
HLD53	0,3593	0,4724	0,6216
HLD97	0,3736	0,5003	0,6411
HLD152	0,3329	0,4246	0,5146
HLD128	0,3750	0,5030	0,6554
HLD134	0,3384	0,4341	0,5752
HLD305	0,3685	0,4901	0,5530
HLD48	0,3695	0,4921	0,6109
HLD114	0,3593	0,4724	0,6353
HLD304	0,3750	0,5031	0,6520
HLD131	0,3725	0,4982	0,6581
HLD38	0,3384	0,4341	0,5834
HLD82	0,3103	0,3865	0,5487
MIN	0,3066	0,3804	0,4664
MAX	0,3750	0,5031	0,6581

Stabilité en cours d'utilisation

Toutes les études de stabilité ont été planifiées conformément à la norme ISO 23640:2015 et à la directive CLSI EP25 (2e édition). La procédure suivante a été suivie pour toutes les études de stabilité: Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a été testé à plusieurs moments et pendant différentes durées. L'analyse des échantillons de chimérisme a été réalisée à l'aide de ChimerisMonitor IVD, l'ADN de génotype unique de XY1726 et XX1180 représentant respectivement le receveur et le donneur.

Nous avons analysé l'ADN XY1726 à génotype unique avec une quantité d'ADN de 1 ng et des échantillons de chimérisme mixte (MC) de XY1726:XX1180 (receveur:donneur) avec une quantité d'ADN de 1 ng représentant les différents intervalles de MC à 4 % et 30 %. Pour vérifier la stabilité du mélange maître, nous avons testé différents intervalles de MC à 30 %, 5 % et 2 % avec 1 ng d'ADN pour un MC à 30 % et 5 % et 2 ng d'ADN pour un MC à 2 %.

L'évaluation finale des différentes conditions comprenait la comparaison entre les moyennes du point de départ (t_0) et les différents points temporels (t_n) et a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$abs. \Delta_n = |\bar{t}_0 - \bar{t}_n|$$

Pour l'étude sur la stabilité en cours d'utilisation, trois expériences ont été réalisées. Une pour tester la stabilité après exposition à des cycles de congélation et décongélation, une pour tester la stabilité après différentes manipulations du mélange maître et une autre pour tester la stabilité des kits lors d'une utilisation simulée après ouverture.

Tous les échantillons testés dans l'expérience de stabilité du mélange maître ont présenté un profil complet de marqueurs pour l'ADN XY1726 à génotype unique et se situaient en dessous des limites de précision et d'exactitude totales basées sur l'erreur de l'essai pour les trois échantillons de MC testés: MC à 30 %, 5 % et 2 % avec leurs limites respectives de 3,31 %, 3,62 % et 1,77 %. Ainsi, le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit n'est pas affecté par une manipulation différente du mélange maître.

Pour la stabilité à la congélation et décongélation, le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ne présente aucun écart critique inacceptable par rapport à T_0 et un profil complet des marqueurs pour l'ADN XY1726 de génotype unique et se situe en dessous des limites de précision totales basées sur l'erreur de l'essai pour les échantillons de MC testés: MC à 30 % et 4 % avec leurs limites respectives de 3,31 % et 2,85 %. Ainsi, le Mentype®

DIPscreen PCR Amplification Kit reste stable pendant jusqu'à 20 cycles de congélation et décongélation.

D'après les résultats de l'utilisation simulée après ouverture, le the Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est stable après sa première ouverture pendant 12 mois, ainsi que pendant 20 cycles de congélation et décongélation.

Données sur les performances cliniques

Conception de l'étude, aspects éthiques et réglementaires

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit et les méthodes de référence ont été testées sur des échantillons prélevés sur des patients après une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Les 10 patients inclus dans cette étude ont été suivis après une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques et la teneur en cellules du donneur dans les échantillons prélevés pendant le suivi a été analysée 10 fois après la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. L'objectif de cette étude était de fournir des preuves cliniques conformément aux § 20 à 24 de la loi sur les dispositifs médicaux "Medizinproduktegesetz" (version MPG du 7 août 2002 (BGBl. I S 3146)). À l'aide de la méthode cytogénétique de référence FISH, il a fallu prouver la concordance avec la méthode PCR basée sur le polymorphisme d'insertion-délétion du dispositif. La confirmation de la commission d'éthique responsable a été reçue le 14 mars 2012.

Méthodes de référence

Comme méthode de référence, une hybridation in situ par fluorescence (FISH) a été réalisée à l'aide du CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) spécifique aux allosomes. Pour appliquer la méthode de référence, seules les paires donneur-receveur de sexe différent ont été incluses dans l'étude. Seuls les résultats cytogénétiques avec un nombre de cellules > 200 ont été évalués, conformément aux recommandations des fabricants.

Extraction et purification de l'ADN

L'ADN a été isolé à l'aide du QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE). L'isolement a été réalisé conformément au protocole du fabricant.

Résultats

La forte corrélation entre le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit et la méthode cytogénétique de référence, avec un $R^2 = 0,9889$, confirme l'applicabilité de cette méthode pour la surveillance du chimérisme après une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques.

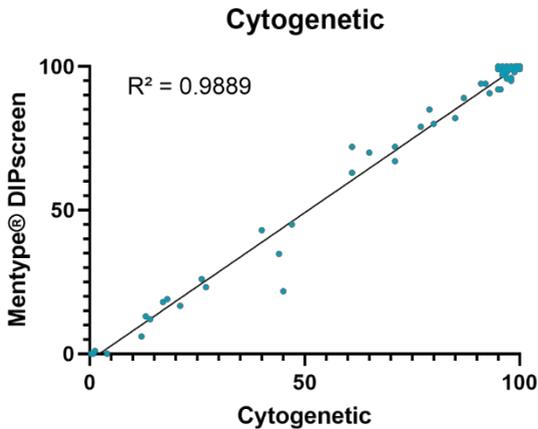


Figure 4 La corrélation des résultats cytogénétiques et des résultats du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est présentée dans le graphique. La régression linéaire montre une corrélation acceptable avec un coefficient de détermination de 0,9889 (N = 87).

La concordance obtenue de 94,25 % (Δ MC de 5 % accepté) avec les résultats de la méthode de référence confirme la fiabilité du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit pour l'interprétation des données cliniques.

Évaluation du diagnostic

Les caractéristiques de performances cliniques ont donné des résultats acceptables. Les résultats ont été évalués pour une LoD de la PCR et de la cytogénétique de 1 % (Bader et al. 2023 [6]). Les paramètres d'évaluation des performances cliniques ont été calculés conformément à l'annexe I, section 9.1b du règlement IVDR ont été jugés non entièrement applicables au Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Le dispositif surveille une plage d'analytes plutôt que la présence d'un analyte. Ainsi, une évaluation du statut négatif et positif de l'analyte n'est pas entièrement applicable.

Tableau 19 Caractéristiques du diagnostic

Caractéristiques du diagnostic	Estimation	Intervalle de confiance inférieur	Intervalle de confiance supérieur
Sensibilité du diagnostic	96,0 %	90,6 %	100,0 %
Spécificité du diagnostic	76,3 %	62,8 %	89,8 %
Précision du diagnostic	87,5 %	80,6 %	94,4 %
Valeur prédictive positive	84,2 %	74,7 %	93,7 %
Valeur prédictive négative	93,5 %	84,9 %	100,0 %
Prévalence	56,8 %	46,5 %	67,2 %

Contrôle qualité

Tous les composants du kit sont soumis à un processus de contrôle qualité rigoureux chez BIOTYPE GmbH. La qualité du kit de test est contrôlée en permanence afin de garantir une utilisation sans restriction. N'hésitez pas à nous contacter si vous avez d'autres questions concernant l'assurance qualité.

Assistance technique

Pour obtenir des conseils techniques, contactez notre équipe d'Customer Support:

e-mail: support@biotype.de

Téléphone: +49 (0)351 8838 400

Références

[1] Clark J, Scott S, Jack A, Lee H, Mason J, Carter G, Pearce L, Jackson T, Clouston H, Sproul A, Keen L, Molloy K, Folarin N, Whitby L, Snowden J, Reilly J, Barnett D (2014) Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): Technical recommendations for the use of Short Tandem Repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. *British Journal of Haematology* 168, 26–37.

[2] Nollet F, Billiet D, Selleslag D, Criel A (2001) Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. *Bone Marrow Transplantation* 28, 511-518.

[3] Westgard S, Bayat H, Westgard JO (2018) Analytical Sigma metrics: A review of Six Sigma implementation tools for medical laboratories, *Biochimica medica*

[4] Pettersson L, Vezzi F, Vonlanthen S, Alwegren K, Hedrum A, Hauzenberger D (2021) Development and performance of a next generation sequencing (NGS) assay for monitoring of mixed chimerism, *Clinica Chimica Acta*

[5] Bader P, Bornhäuser M, Grigoleit G-U, Kröger N für die DAG-KBT, Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V. Monitoring, Chimärismusanalysen und Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD). Allogene Stammzelltransplantation. Onkopedia Leitlinien. Status March 2023 www.onkopedia.com.

Restrictions d'utilisation

- Les procédures décrites dans ce mode d'emploi doivent être suivies à la lettre. Tout écart peut entraîner l'échec du test ou donner des résultats erronés.
- L'utilisation de ce produit est réservée aux utilisateurs professionnels en laboratoire ayant reçu une formation spécifique sur les techniques de PCR et l'électrophorèse capillaire sur gel.
- Des procédures appropriées de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons sont nécessaires pour garantir la performance optimale de ce test.
- Le kit a uniquement été validé pour une utilisation avec des échantillons de sang total veineux périphérique humain analysés sur les instruments de PCR répertoriés au chapitre Instruments et logiciel
- Cet essai ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction d'acide nucléique doivent être utilisées avant d'utiliser cet essai.
- La contamination des échantillons d'ADN par du sang nuit aux performances du produit. Veillez à ce qu'aucune contamination ne se produise pendant l'Extraction de l'ADN et répétez l'extraction si nécessaire.
- Le kit n'a été validé qu'avec les kits décrits au chapitre Réactifs, kits et consommables pour l'extraction et la purification de l'ADN.
- De bonnes pratiques de laboratoire sont requises pour garantir les performances du kit.
- Les résultats doivent être interprétés en consultation avec des cliniciens qui combinent les résultats des analyses de chimérisme avec ceux d'autres méthodes thérapeutiques ou de diagnostic pertinentes.
- L'interprétation des résultats doit tenir compte de la possibilité de résultats faussement négatifs et faussement positifs.

- Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ne peut pas être utilisé si le donneur et le receveur sont des jumeaux identiques.
- Les doubles transplantations n'ont pas été validées dans le cadre de l'évaluation des performances.
- Les échantillons contenant de l'ADN dégradé peuvent affecter la capacité à détecter les loci INDEL/DIP et spécifiques au sexe
- N'utilisez pas de composant périmé ou mal conservé.
- L'analyse du chimérisme a été validée à l'aide de marqueurs informatifs spécifiques au patient (pour toutes les plages de chimérisme).
- Les échantillons provenant de différents groupes ethniques peuvent présenter des caractéristiques génétiques distinctes, telles que des fréquences alléliques variables, ce qui pourrait limiter le pouvoir de discrimination ou d'amplification. La fréquence allélique de certains marqueurs DIP dans plusieurs populations a été évaluée. La puissance combinée de la discrimination est élevée, avec des valeurs supérieures à 0,99. Cela suggère un risque relativement faible que le test d'un patient rencontre des difficultés d'amplification. Cependant, les données démographiques sont actuellement disponibles pour les personnes de type caucasien. L'impact potentiel pour les autres groupes ethniques ne peut pas encore être estimé.

Informations sur les commandes

Envoyez vos commandes par e-mail à l'adresse sales@biotype.de.

Produit	Taille de l'emballage	Numéro de commande
Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit	25 réactions	45-12300-0025
	100 réactions	45-12300-0100
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	licence de démonstration	
	licence d'1 an	46-14800-0000
	licence de 3 ans	

REMARQUE



Les composants individuels des kits ne peuvent pas être commandés séparément.

Marques et clauses de non-responsabilité

Mentype® et Chimera® sont des marques déposées de BIOTYPE GmbH.

Autres marques: ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® et Applied Biosystems® (Applied Biosystems LLC), QIAamp® (Qiagen); POP-4™ (Europe: Applied Biosystems LLC, États-Unis: Life Technologies Corporation).

La PCR est protégée par des brevets. Les titulaires de brevets sont Hoffmann-La Roche Inc. et F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Les noms déposés, les marques, etc. utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement marqués comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est un kit de diagnostic marqué CE conformément au règlement européen (UE) 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Le produit n'est pas sous licence avec Health Canada et n'est pas autorisé ou approuvé par FDA .

Le dispositif médical n'est pas disponible dans tous les pays.

© 2025 BIOTYPE GmbH, tous droits réservés.

Explication des symboles



Fabricant



Code du lot



Contient suffisamment de réactifs pour <N> tests



Consulter le mode d'emploi électronique



Date limite d'utilisation



Limite de température



Numéro de catalogue



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Tenir à l'écart de la lumière du soleil



Garder au sec



Identifiant unique du dispositif

Autres symboles utilisés dans ce mode d'emploi :

i



texte souligné en bleu

texte souligné en noir

texte en italique, cursif, gras

Conseils utiles

Attention, veuillez à respecter cette consigne!

Liens vers des contenus externes tels que des pages d'accueil, des adresses e-mail

Liens croisés dans le document pour faciliter la navigation

Champs sur lesquels il faut cliquer dans un logiciel

Annexe

Électrophérogrammes des échantillons de référence

Vous trouverez sur les pages suivantes des exemples d'électrophérogrammes de l'Mentype® DIPscreen Allelic Ladder ([Figure 5](#)), de l'Control DNA XY82 (PC, [Figure 6](#)) et d'un contrôle sans matrice (NTC, [Figure 7](#)).

Tous les échantillons ont été amplifiés sur un thermocycleur PCR ProFlex et analysés sur un Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (POP-4™, 36 cm array) à l'aide du paramètre de série validé. L'analyse des données a été effectuée à l'aide de GeneMapper ID-X, version 1.6. Les modèles des Bins, Panels et la Analysis Method ont été utilisés conformément au [Tableau 12](#).

Les électrophérogrammes sont agrandis à une longueur de fragment comprise entre 70 et 420 pb (axe x). La plage générale pour l'analyse de la longueur des fragments (axe x) à l'aide du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est comprise entre 50 pb et 550 pb. La mise à l'échelle de l'axe y a été effectuée individuellement selon la description se trouvant sous chaque figure ([Figure 5](#), [Figure 6](#), [Figure 7](#)).

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

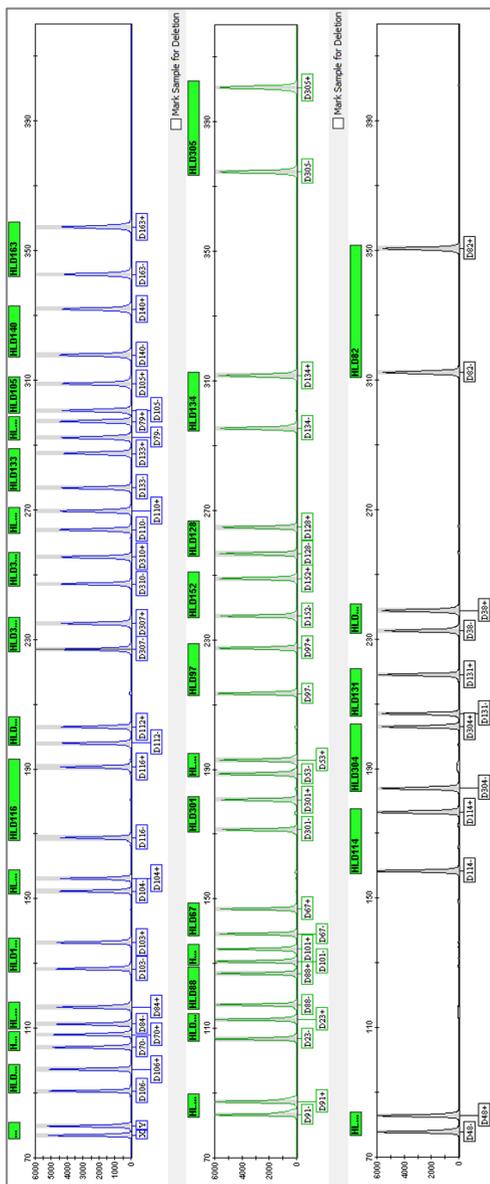


Figure 5 Mentype® DIPscreen Allelic Ladder
 Agrandissement à 6 000 RFU (axe y) et 70 – 420 pb (axe x)

Control DNA XY82 (PC)

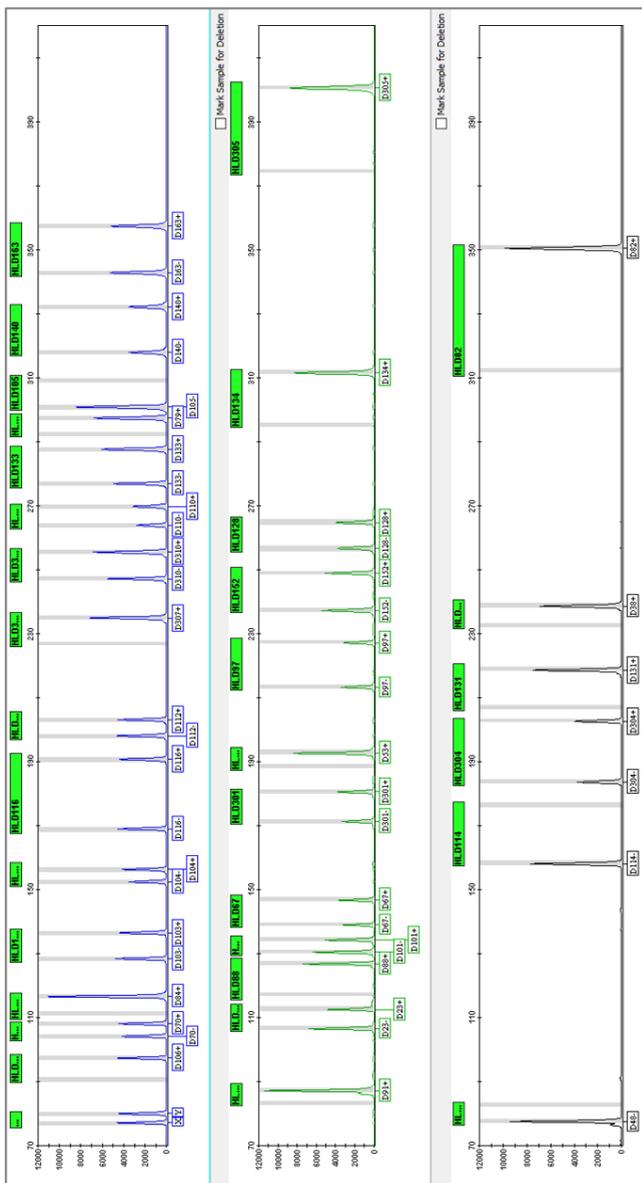


Figure 6 Control DNA XY82 (PC)

Aggrandissement à 12 000 RFU (axe y) et 70 – 420 pb (axe x)

Contrôle sans matrice (NTC)



Figure 7 Contrôle sans matrice (NTC)
 Agrandissement à 1 000 RFU (axe y) et 70 – 420 pb (axe x)

Longueurs des fragments et des allèles

Le Tableau 20 présente la longueur des fragments d'allèles individuels qui se réfèrent à la DNA Size Standard 550 (BTO). Toutes les analyses ont été effectuées sur un ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer avec un polymère POP-4™. Différents instruments d'analyse, normes de taille d'ADN ou polymères peuvent donner lieu à des longueurs de fragments différentes. De plus, un alignement visuel avec l'échelle allélique est recommandé.

Tableau 20 Longueurs de fragments de l'Mentype® DIPscreen Allelic Ladder analysées sur un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer avec un polymère POP-4™, * arrondies à l'entier le plus proche

Marqueur/ Canal bleu	Taille -DIP [pb]*	Taille +DIP [pb]*	Marqueur/ Canal vert	Taille -DIP [pb]*	Taille +DIP [pb]*	
Amelogenin	77 (X)	80 (Y)	HLD91	84	88	
HLD106	91	98	HLD23	107	113	
HLD70	104	108	HLD88	118	128	
HLD84	112	117	HLD101	131	135	
HLD103	129	138	HLD67	140	148	
HLD104	153	157	HLD301	172	182	
HLD116	170	192	HLD53	190	194	
HLD112	199	204	HLD97	214	228	
HLD307	228	236	HLD152	239	250	
HLD310	248	257	HLD128	258	266	
HLD110	264	270	HLD134	296	312	
HLD133	278	288	HLD305	375	401	
HLD79	294	299	Marqueur/ Canal jaune	Taille -DIP [pb]*	Taille +DIP [pb]*	
HLD105	302	310				
HLD140	318	333		HLD48	78	83
HLD163	344	358		HLD114	159	177
				HLD304	184	203
				HLD131	208	220
				HLD38	234	240
			HLD82	314	352	

Exemples d'évaluation qualitative des loci

Tableau 21 Exemples d'évaluation qualitative des loci informatifs

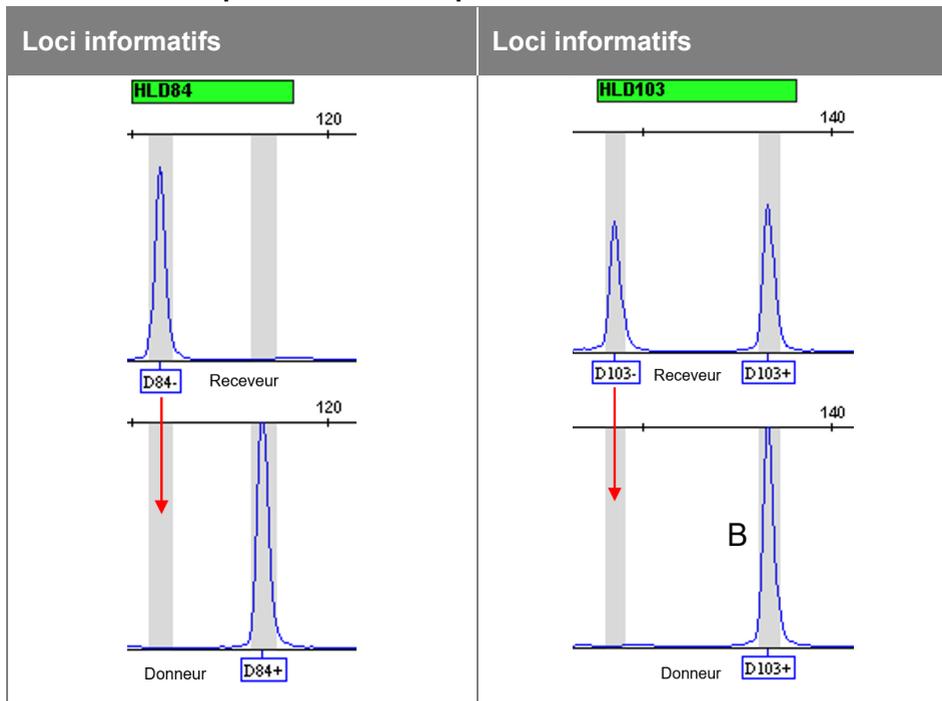
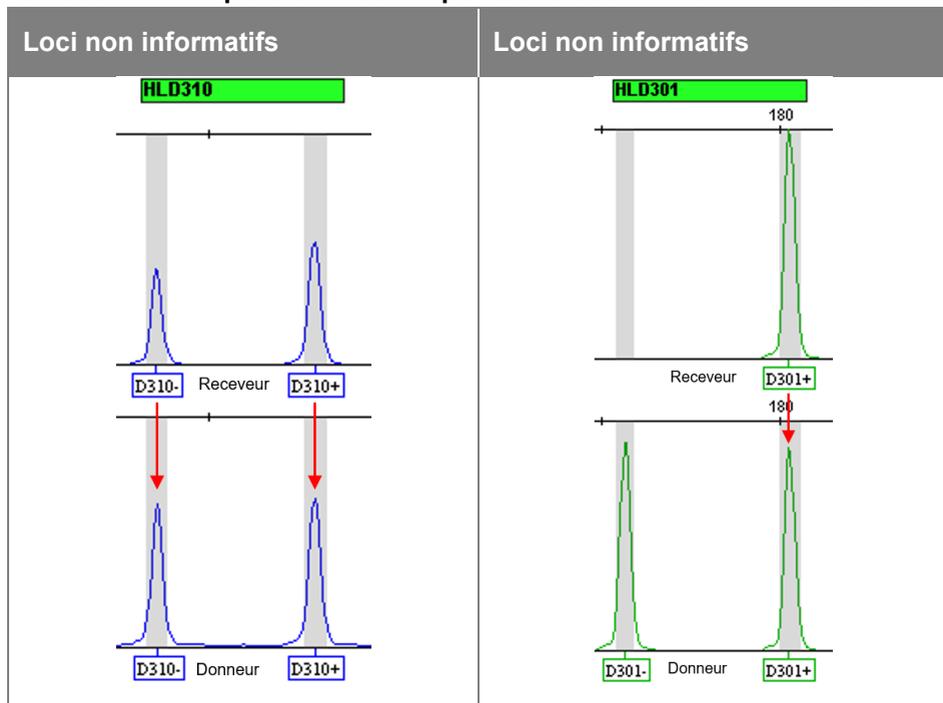


Tableau 22 Exemple d'évaluation qualitative des loci non informatifs



BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Commande

sales@biotype.de

Service clients et assistance

support@biotype.de

